



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **G** brauchsmust rschrift  
10 **DE 200 23 125 U 1**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**A 61 K 31/713**  
A 61 K 48/00

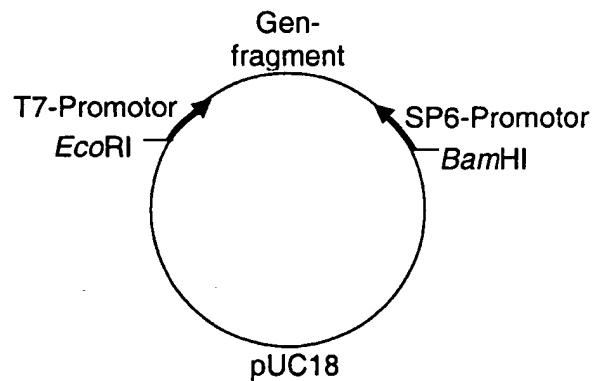
30  
DE 200 23 125 U 1

21 Aktenzeichen: 200 23 125.1  
67 Anmeldetag: 29. 1. 2000  
aus Patentanmeldung: 00 91 0510.7  
47 Eintragungstag: 15. 5. 2003  
43 Bekanntmachung  
im Patentblatt: 18. 6. 2003

73 Inhaber:  
Ribopharma AG, 95326 Kulmbach, DE  
74 Vertreter:  
Dr. Gassner & Partner, 91052 Erlangen

54 Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens

57 Medikament mit mindestens einem 15 bis 49 Basen-  
paare aufweisenden Oligoribonukleotid mit doppelsträn-  
giger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression ei-  
nes vorgegebenen Zielgens in Säugerzellen, wobei ein  
Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest ab-  
schnittsweise komplementären, höchstens 49 aufeinan-  
derfolgende Nukleotidpaare aufweisenden Bereich I auf-  
weist und ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur  
komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Ein-  
zelsträngen gebildet ist.



DE 200 23 125 U 1

03.04.03

Einzutragende Fassung:

1

**Medikament und doppelsträngiges Oligoribonukleotid zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens**

- 5 Die Erfindung betrifft ein Medikament, ein doppelsträngiges Oligoribonukleotid (dsRNA) und einen dafür kodierenden Vektor nach den Merkmalen der Ansprüche 1, 33 und 34.

Ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen  
10 Zielgens in einer Zelle, bei dem ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich aufweist, ist aus der nachveröffentlichten WO 99/32619 bekannt. Das bekannte Verfah-  
15 ren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 50 Basen aufweist. Zur Erzielung einer effizienten Hemmung ist eine Länge der identi-  
20 schen Sequenz von 300 bis 1000 Basenpaare erforderlich. Der Herstellungsaufwand eines solchen Oligoribonukleotids ist hoch.

Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit beson-  
25 deren Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-RNA handelt es sich um ein RNA-Molekül, das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbe-  
30 sondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden.  
- Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie

03.04.03

2

die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.

Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlge-  
5 paarte doppelsträngige RNA (dsRNA) und biologisch aktive fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die  
10 Einzelstränge gehen nicht-reguläre, sogenannte "Nicht-Watson-Crick"-Basenpaarungen miteinander ein, so daß fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn nicht-sequenzspezifische  
15 dsRNA in die Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Induktion von Interferon, wodurch die Virusvermehrung gehemmt werden soll. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.

20 Aus Fire, A. et al., NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, daß die besondere Wirksamkeit der ver-  
25 wendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA bzw. durch sie induzierte Enzyme zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in Säugerzellen und humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts  
30 ausgesagt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein

422434-kreutzer-an-DE 200 23 125 U1

Medikament, ein Oligoribonukleotid und ein dafür kodierender Vektor angegeben werden, mit dem eine besonders wirksame Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens bewirkbar ist.

- 5 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 33 und 34 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 2 bis 32 und 35 bis 64.

Nach Maßgabe der Erfindungen ist jeweils vorgesehen, daß der  
10 zum Zielgen komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

Erfindungsgemäß sind ein Oligoribonukleotid oder ein dafür kodierender Vektor vorgesehen. Das Oligoribonukleotid weist zu-  
15 mindest abschnittsweise eine definierte Nukleotidsequenz auf. Der definierte Abschnitt kann auf den komplementären Bereich I beschränkt sein. Es kann aber auch sein, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid insgesamt eine definierte Nukleotidsequenz aufweist.

20

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs I von höchstens 49 Basenpaaren eine wirksame Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit ge-  
25 ringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Insbesondere dsRNA mit einer Länge von mehr als 50 Nukleotidpaaren induziert in Säugerzellen und humanen Zellen bestimmte zelluläre Mechanismen, z.B. die dsRNA-abhängige Pro-  
30 teinkinase oder das 2-5A-System. Das führt zum Verschwinden des durch die eine definierte Sequenz aufweisende dsRNA vermittelten Interferenzeffektes. Dadurch wird die Proteinbiosynthese in der Zelle blockiert. Insbesondere dieser Nachteil wird durch die vorliegende Erfindung beseitigt.

Weiterhin ist die Aufnahme von dsRNA mit kurzer Kettenlänge in die Zelle bzw. in den Zellkern gegenüber länger-kettigen dsRNAs deutlich erleichtert.

5

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA oder der Vektor kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen der dsRNA bzw. des Vektors in vorgegebene Zielzellen.

15 Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal weist die dsRNA 10 bis 1000, vorzugsweise 15 bis 49, Basenpaare auf. Die dsRNA kann also länger als der zum Zielgen komplementäre Bereich I sein. Der komplementäre Bereich I kann endständig angeordnet oder in die dsRNA eingeschaltet sein. Eine solche dsRNA bzw.  
20 ein zur Kodierung derselben vorgesehener Vektor können synthetisch bzw. enzymatisch mit gängigen Verfahren hergestellt werden.

Das zu hemmende Gen wird zweckmäßigerweise in eukaryontischen  
25 Zellen exprimiert. Das Zielgen kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen. Es kann auch in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert werden. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein. - Es wird die Herstellung von Mitteln zur Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs, viraler Erkrankungen oder Morbus Alzheimer ermöglicht.

Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein. Es wird die Bereitstellung von Mitteln zur Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten ermöglicht.

5

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II wird aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen oder aus selbst-  
10 komplementären Bereichen eines, vorzugsweise zirkulär ausgebildeten, topologisch geschlossenen RNA-Einzelstrangs gebildet.

Die Enden der dsRNA können modifiziert werden, um einem Abbau  
15 in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Eine Dissoziation tritt insbesondere bei Verwendung niedriger Konzentrationen oder kurzer Kettenlängen auf. Zur besonders wirksamen Hemmung der Dissoziation kann der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei,  
20 weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. - Eine erfindungsgemäße dsRNA, deren Dissoziation vermindert ist, weist eine höhere Stabilität gegen enzymatischen und chemischen Abbau in der Zelle bzw. im Organismus auf.

25

Die chemische Verknüpfung wird zweckmäßigerweise durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-  
30 Ionenkoordination gebildet. Sie kann nach einem besonders vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Ende/n des komplementären Bereichs II hergestellt werden.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, daß die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind. Die chemische Verknüpfung kann auch durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet werden. Von Vorteil ist es ferner, daß die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird. Sie kann außerdem durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet werden.

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen. Ferner kann die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet werden. Vorzugsweise wird die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt.

Die chemische Verknüpfung kann zweckmäßigerweise durch ultraviolette Licht induziert werden.

Die Nukleotide der dsRNA können modifiziert sein. Dies wirkt einer Aktivierung einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der Zelle entgegen. Vorteilhafterweise ist mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt. Mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des

komplementären Bereichs II kann auch ein sogenanntes "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring sein. Vorteilhafterweise sind mehrere Nukleotide "locked nucleotides".

5

Nach einer weiteren besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.

Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Es kann das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthalten. Die Verwendung derartiger Hüllproteine ist z.B. aus der DE 196 18 797 A1 bekannt, deren Offenbarungsgehalt hiermit einbezogen wird. - Die vorgenannten Merkmale erleichtert wesentlich das Einführen der dsRNA bzw. des Vektors in die Zelle.

20 Vorzugsweise ist bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt. Das gebildete Konstrukt ist besonders stabil.

25 Die dsRNA kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein.- Die Zelle kann eine Vertebraenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Es können mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder mindestens ein dafür kodierender Vektor in die Zelle eingeführt werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist. Dadurch ist es möglich gleichzeitig die Expression mindestens zwei verschiedener



Zielgene zu hemmen. Um die Expression einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der Zelle zu unterdrücken, ist eines der Zielgene vorteilhafterweise das PKR-Gen. Dadurch kann die PKR-Aktivität in der Zelle wirksam unterdrückt werden.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ferner ein Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Es hat sich überraschend gezeigt, daß eine solche dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in Säugerzellen eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens vorgesehen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären Bereich I aufweist. - Das vorgeschlagene Medikament weist die vorgenannten Vorteile auf. Durch die Verwendung eines Vektors können insbesondere Herstellungskosten eingespart werden.

Nach einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weist der komplementäre Bereich I höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare auf. - Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs I von höchstens 49 Basenpaaren eine effiziente Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribo-

03.04.03

9

nukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.

Hinsichtlich vorteilhafter Ausgestaltungen des Medikaments  
5 wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

Nachfolgend werden anhand der Figuren Ausführungsbeispiele der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 die schematische Darstellung eines Plasmids für die *in vitro*-Transkription mit T7- und SP6-Polymerase,
- 5 Fig. 2 RNA nach Elektrophorese auf einem 8%igen Polyacrylamidgel und Ethidiumbromidfärbung,
- Fig. 3 eine Darstellung radioaktiver RNA-Transkripte nach Elektrophorese auf einem 8%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff mittels eines "Instant Imagers" und
- 10 Fig. 4 a - e Texas-Rot- und YFP-Fluoreszenz in murinen Fibroblasten.

15

#### Ausführungsbeispiel 1:

Die Inhibition der Transkription wurde durch sequenzhomologe dsRNA in einem *in vitro*-Transkriptionssystem mit einem Kernextrakt aus humanen HeLa-Zellen nachgewiesen. Die DNA-Matrize

20 für diesen Versuch war das mittels *Bam*HI linearisierte Plasmid pCMV1200.

#### Herstellung der Matrizenplasmide:

Zur Verwendung bei der enzymatischen Synthese der dsRNA wurde

25 das in Fig. 1 dargestellte Plasmid konstruiert. Dazu wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der "positive control DNA" des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskits der Firma Promega, Madison, USA als DNA-Matrize durchgeführt. Einer der verwendeten Primer enthielt die Se-

30 quenz einer *Eco*RI-Schnittstelle und des T7-RNA-Polymerase-Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 1. Der andere Primer enthielt die Sequenz einer *Bam*HI-Schnittstelle und des SP6-RNA-Polymerase-Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 2. Darüber hinaus wiesen beide Primer an ihren 3'-Enden identische bzw.

komplementäre Bereiche zur DNA-Matrize auf. Die PCR wurde mittels des "Taq PCR Core Kits" der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem Volumen von 100  $\mu$ l wurden 1,5 mM  $MgCl_2$ , je 200  $\mu$ M dNTP, je 0,5  $\mu$ M Primer, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase und etwa 100 ng "positive control DNA" als Matrize in PCR-Puffer eingesetzt. Nach der anfänglichen Denaturierung der Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94°C für 5 Minuten erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen von je 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer und 1,5 - 2 Minuten Polymerisation bei 72°C. Nach einer Schlußpolymerisation von 5 Minuten bei 72°C wurden 5  $\mu$ l des Reaktionsansatzes durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Länge des so amplifizierten DNA-Fragmentes betrug 400 Basenpaare, wobei 340 Basenpaare der "positive control DNA" entsprachen. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit *EcoRI* und *BamHI* hydrolysiert und nach erneuter Aufreinigung zur Ligation mit einem ebenfalls durch *EcoRI* und *BamHI* hydrolysierten pUC18 Vektor eingesetzt. Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Das erhaltene Plasmid (pCMV5) trägt ein DNA-Fragment, das am 5'-Ende von dem T7- und am 3'-Ende von dem SP6-Promotor flankiert wird. Durch Linearisierung des Plasmids mit *BamHI* kann es *in vitro* mit der T7-RNA-Polymerase zur run-off-Transkription einer 340 Nukleotide langen, in Sequenzprotokoll Nr. 3 dargestellten, einzelsträngigen RNA eingesetzt werden. Wird das Plasmid mit *EcoRI* linearisiert, kann es zur run-off-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase eingesetzt werden, wobei der komplementäre Strang entsteht. Entsprechend dem zuvor dargestellten Verfahren wurde auch eine 23 Nukleotide längere RNA synthetisiert. Dazu wurde eine in Sequenzprotokoll Nr. 4 dargestellte DNA über die *EcoRI* und *BamHI*-Schnittstellen mit dem pUC18 Vektor ligiert.

Als DNA-Matrize für die *in vitro*-Transkription mit HeLa-Kernextrakt wurde das Plasmid pCMV1200 konstruiert. Dazu wurde ein 1191 bp großes EcoRI/BamHI-Fragment der im HeLaScribe<sup>®</sup> Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit enthaltenen Positivkontroll-DNA mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte Fragment umfaßt den 828 bp großen "unmittelbar frühen" CMV-Promotor und ein 363 bp großes transkribierbares DNA-Fragment. Das PCR-Produkt wurde über "T-Überhang"-Ligation mit dem Vektor pGEM-T ligiert. Am 5'-Ende des Fragments ist eine BamHI-Schnittstelle. Das Plasmid wurde durch Hydrolyse mit BamHI linearisiert und als Matrize zur run-off-Transkription eingesetzt.

#### *in vitro*-Transkription der komplementären Einzelstränge:

15. pCMV5-Plasmid-DNA wurde mit EcoRI bzw. BamHI linearisiert. Sie wurde als DNA-Matrize für eine *in vitro*-Transkription der komplementären RNA-Einzelstränge mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet. Dazu wurde das "Riboprobe *in vitro* Transcription" System der Firma Promega, Madison, USA eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNA in 100 µl Transkriptionspuffer und 40 U T7- oder SP6-RNA-Polymerase 5 - 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 2,5 µl RNase-freier DNase RQ1 und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C abgebaut. Der Transkriptionsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 300 µl aufgefüllt und durch Phenolextraktion gereinigt. Die RNA wurde durch Zugabe von 150 µl 7 M Ammoniumacetat und 1125 µl Ethanol gefällt und bis zur Hybridisierung bei -65°C aufbewahrt.

#### Herstellung der RNA-Doppelstränge:

Zur Hybridisierung wurden 500 µl der in Ethanol aufbewahrten und gefällten einzelsträngigen RNA abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde getrocknet und in 30 µl PIPES-Puffer, pH 6,4 in Gegenwart von 80 % Formamid, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA

aufgenommen. Jeweils 15  $\mu$ l der komplementären Einzelstränge wurden zusammengegeben und für 10 Minuten auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C über Nacht inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

5

Bei der Hybridisierung wurden nur annähernd äquimolare Mengen der beiden Einzelstränge eingesetzt. Dadurch enthielten die dsRNA-Präparationen einzelsträngige RNA (ssRNA) als Kontamination. Um diese ssRNA-Kontaminationen zu entfernen, wurden die  
 10 Ansätze nach der Hybridisierung mit den einzelstrangspezifischen Ribonukleasen RNase A aus Rinderpankreas und RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* behandelt. RNase A ist eine für Pyrimidine spezifische Endoribonuklease. RNase T1 ist eine Endoribonuklease, die bevorzugt auf der 3'-Seite von Guanosinen  
 15 schneidet. dsRNA ist kein Substrat für diese Ribonukleasen. Für die RNase-Behandlung wurde zu den Ansätzen in 300  $\mu$ l Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl und 5 mM EDTA 1,2  $\mu$ l RNaseA in einer Konzentration von 10 mg/ml und 2  $\mu$ l RNaseT1 in einer Konzentration von 290  $\mu$ g/ml zugegeben. Die Ansätze wurden 1,5 Stunden bei  
 20 30°C inkubiert. Danach wurden die RNasen durch Zugabe von 5  $\mu$ l Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml sowie 10  $\mu$ l 20%iges SDS und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C denaturiert. Die dsRNA wurde durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Um die Vollständigkeit des RNase-Verdaus  
 25 überprüfen zu können, wurden zwei Kontrollansätze mit ssRNA analog zu den Hybridisierungsansätzen behandelt.

Das getrocknete Pellet wurde in 15  $\mu$ l TE-Puffer, pH 6,5 aufgenommen und auf einem 8%igen Gel einer nativen Polyacrylamidgелеlektrophorese unterzogen. Das Acrylamidgel wurde anschließend in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und in einem Wasserbad gespült. Fig. 2 zeigt die auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemachte RNA. Die auf Spur 1 aufgetragene sense- und die auf Spur 2 aufgetragene antisense-RNA zeigten unter den

gewählten Bedingungen ein anderes Laufverhalten als die auf Spur 3 aufgetragene dsRNA des Hybridisierungsansatzes. Die auf den Spuren 4 bzw. 5 aufgetragene RNase-behandelte sense- bzw. antisense-RNA erzeugte keine sichtbare Bande. Dies zeigt, daß die einzelsträngigen RNAs vollständig abgebaut wurden. Die auf Spur 6 aufgetragene RNase-behandelte dsRNA des Hybridisierungsansatzes ist resistent gegenüber der RNase-Behandlung. Die im nativen Gel im Vergleich zu der auf Spur 3 aufgetragenen dsRNA schneller wandernde Bande resultiert aus dsRNA, die frei von ssRNA ist. Neben der dominierenden Hauptbande treten nach der RNase-Behandlung schwächere, schneller wandernde Banden auf.

in vitro-Transkriptions-Test mit menschlichem Zellkernextrakt:

- 15 Unter Verwendung des HeLaScribe<sup>®</sup> Nuclear Extract in vitro Transkriptionskits der Firma Promega, Madison, USA wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen, im Plasmid pCMV1200 enthaltenen, zur "positive control DNA" homologen DNA-Fragments in Gegenwart der sequenzhomologen dsRNA
- 20 (dsRNA-CMV5) bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß der nicht-sequenzhomologen, dem "Gelb fluoreszierenden Protein" (YFP)-Gen entsprechenden dsRNA (dsRNA-YFP) untersucht. Diese dsRNA war analog zur sequenzhomologen dsRNA hergestellt worden. Die Sequenz eines Stranges dieser dsRNA ist Sequenzprotokoll Nr. 5
- 25 zu entnehmen. Als Matrize für die run-off-Transkription diente das Plasmid pCMV1200. Es trägt den "unmittelbar frühen" Promotor des Cytomegalievirus, der von der eukaryotischen RNA-Polymerase II erkannt wird, und ein transkribierbares DNA-Fragment. Die Transkription erfolgte mittels des HeLa-
- 30 Kernextrakts, der alle notwendigen Proteine für eine Transkription enthält. Durch Zugabe von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rGTP zum Transkriptionsansatz wurde radioaktiv markiertes Transkript erhalten. Das verwendete [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]rGTP hatte eine spezifische Aktivität von 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Pro Ansatz wurden 3 mM MgCl<sub>2</sub>, je

05.11.02

15

400  $\mu\text{M}$  rATP, rCTP, rUTP, 16  $\mu\text{M}$  rGTP, 0,4  $\mu\text{M}$  [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]rGTP und je nach Versuch 1 fmol linearisierte Plasmid-DNA und verschiedene Mengen an dsRNA in Transkriptionspuffer eingesetzt. Jeder Ansatz wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf ein Volumen von 8,5  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die

5 Ansätze wurden vorsichtig gemischt. Zum Starten der Transkription wurden 4 U HeLa-Kernextrakt in einem Volumen von 4  $\mu\text{l}$  zugegeben und für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 87,5  $\mu\text{l}$  auf 30°C erwärmten Stopp-Mix beendet. Zur Entfernung der Proteine wurden die Ansätze mit

10 100  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), gesättigt mit TE-Puffer, pH 5,0, versetzt und 1 Minute kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde etwa 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wurden 250  $\mu\text{l}$  Ethanol zugegeben.

15 Die Ansätze wurden gut gemischt und für mindestens 15 Minuten auf Trockeneis/Methanol inkubiert. Zur Präzipitation der RNA wurden die Ansätze 20 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 15 Minuten im Vakuum getrocknet und in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspen-

20 diert. Zu jedem Ansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  denaturierender Probenpuffer zugegeben. Die Trennung des freien GTP vom entstandenen Transkript erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 8%igen Gel mit 7 M Harnstoff. Die bei der Transkription mit HeLa-Kernextrakt gebildeten RNA-

25 Transkripte in denaturierendem Probenpuffer wurden für 10 Minuten auf 90°C erhitzt und 10  $\mu\text{l}$  davon sofort in die frisch gespülten Probentaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA. Die Menge der bei der Transkription gebildeten radioaktiven ssRNA wurde nach der Elektrophorese mit Hilfe

30 eines *Instant Imager* analysiert.

Fig. 3 zeigt die mittels des *Instant Imagers* dargestellte radioaktive RNA aus einem repräsentativen Tests. Es wurden aus folgenden Transkriptionsansätzen gewonne Proben aufgetragen:

05.09.03 12:51



- Spur 1: ohne Matrizen-DNA, ohne dsRNA;  
 Spur 2: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;  
 Spur 3: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5  $\mu$ g dsRNA-YFP;  
 5 Spur 4: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5  $\mu$ g dsRNA-YFP;  
 Spur 5: 50 ng Matrizen-DNA, 3  $\mu$ g dsRNA-YFP;  
 Spur 6: 50 ng Matrizen-DNA, 5  $\mu$ g dsRNA-YFP;  
 Spur 7: ohne Matrizen-DNA, 1,5 dsRNA-YFP;  
 Spur 8: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;  
 10 Spur 9: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5  $\mu$ g dsRNA-CMV5;  
 Spur 10: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5  $\mu$ g dsRNA-CMV5;  
 Spur 11: 50 ng Matrizen-DNA, 3  $\mu$ g dsRNA-CMV5;  
 Spur 12: 50 ng Matrizen-DNA, 5  $\mu$ g dsRNA-CMV5;
- 15 Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von sequenzhomologer dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne dsRNA sowie auch zu den Ansätzen mit nicht-sequenzhomologer dsRNA-YFP. Die Positivkontrolle in Spur 2 zeigt, daß bei der *in vitro*-Transkription mit HeLa-
- 20 Kernextrakt radioaktives Transkript gebildet wurde. Der Ansatz dient zum Vergleich mit den Transkriptionsansätzen, die in Gegenwart von dsRNA inkubiert worden waren. Die Spuren 3 bis 6 zeigen, daß die Zugabe von nicht-sequenzspezifischer dsRNA-YFP keinen Einfluß auf die Menge des gebildeten Transkripts hat.
- 25 Die Spuren 9 bis 12 zeigen, daß die Zugabe einer zwischen 1,5 und 3  $\mu$ g liegenden Menge sequenzspezifischer dsRNA-CMV5 zu einer Abnahme der gebildeten Transkript-Menge führt. Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte nicht auf der dsRNA, sondern auf einer möglicherweise bei der Herstellung der dsRNA
- 30 unabsichtlich mitgeführten Kontamination beruhen, wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Einzelstrang-RNA wurde wie oben beschrieben transkribiert und anschließend der RNase-Behandlung unterzogen. Mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die ssRNA vollständig

abgebaut worden war. Dieser Ansatz wurde wie die Hybridisierungsansätze einer Phenolextraktion und einer Ethanolfällung unterzogen und anschließend in TE-Puffer aufgenommen. Auf diese Weise wurde eine Probe erhalten, die keine RNA enthielt, aber mit den gleichen Enzymen und Puffern behandelt worden war wie die dsRNA. Spur 8 zeigt, daß der Zusatz dieser Probe keinen Einfluß auf die Transkription hatte. Die Abnahme des Transkripts bei Zugabe sequenzspezifischer dsRNA kann deshalb eindeutig der dsRNA selbst zugeschrieben werden. Die Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA bei einem menschlichen Transkriptionssystem zeigt eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

15

#### Ausführungsbeispiel 2:

Als Testsystem für diese *in vivo*-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, ATCC CRL-1658. Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde das YFP-Gen in die Zellkerne eingebracht. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mittransfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Diese dsRNA-YFP ist über eine Länge von 315 bp zum 5'-Bereich des YFP-Gens homolog. Die Nukleotidsequenz eines Strangs der dsRNA-YFP ist in Sequenzprotokoll Nr. 5 wiedergegeben. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte 3 Stunden nach Injektion anhand der grün-gelben Fluoreszenz des gebildeten YFP.

#### Konstruktion des Matrizenplasmids und Herstellung der dsRNA:

Als Matrize für die Herstellung der YFP-dsRNA mittels T7- und SP6-*in vitro*-Transkription wurde ein Plasmid nach dem gleichen Prinzip wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben konstruiert. Das gewünschte Genfragment wurde unter Verwendung des Primers Eco\_T7\_YFP gemäß Sequenzprotokoll Nr. 6 und Bam\_SP6\_YFP gemäß

Sequenzprotokoll Nr. 7 mittels PCR amplifiziert und analog zu der obigen Beschreibung zur Herstellung der dsRNA verwendet. Die erhaltene dsRNA-YFP ist identisch mit der in Ausführungsbeispiel 1 als nicht-sequenzspezifische Kontrolle verwendeten dsRNA.

Es wurde eine am 3'-Ende der RNA gemäß Sequenzprotokoll Nr. 8 über eine C18-Linkergruppe chemisch mit dem 5'-Ende der komplementären RNA verknüpfte dsRNA (L-dsRNA) hergestellt. Dazu wurden mit Disulfid-Brücken modifizierte Synthone verwendet. Das 3'-terminale Synthon ist über den 3'-Kohlenstoff mit einer aliphatischen Linker-Gruppe über eine Disulfidbrücke an den festen Träger gebunden. Bei dem zum 3'-terminalen Synthon des einen Oligoribonukleotids komplementären 5'-terminalen Synthon des komplementären Oligoribonukleotids ist die 5'-Tritylschutzgruppe über einen weiteren aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke gebunden. Nach Synthese der beiden Einzelstränge, Entfernen der Schutzgruppen und Hybridisierung der komplementären Oligoribonukleotide gelangen die entstehenden Thiolgruppen in räumliche Nachbarschaft zueinander. Durch Oxidation werden die Einzelstränge über ihre aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Anschließend erfolgt Reinigung mit Hilfe der HPLC.

#### 25 Vorbereitung der Zellkulturen:

Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Rinderserum unter 7,5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37°C in Kulturschalen inkubiert und vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA. Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden die Zellen in Petrischalen überführt und bis zu Bildung von Mikrokolonien weiter inkubiert.

#### Mikroinjektion:

Die Kulturschalen wurde zur Mikroinjektion für ca. 10 Minuten aus dem Inkubator genommen. Es wurde in ca. 50 Zellkerne pro Ansatz innerhalb eines markierten Bereichs unter Verwendung des Mikroinjektionssystems AIS der Firma Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland einzeln injiziert. Anschließend wurden die Zellen weitere drei Stunden inkubiert. Für die Mikroinjektion wurden Borosilikat-Glaskapillaren der Firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland mit einem Spitzendurchmesser unter  $0,5 \mu\text{m}$  vorbereitet. Die Mikroinjektion wurde mit einem Mikromanipulator der Firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan durchgeführt. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden, der Druck ca. 100 hPa. Für die Transfektion wurde das Plasmid pCDNA-YFP verwendet, das ein ca. 800 bp großes BamHI/EcoRI-Fragment mit dem Gen des YFP im Vektor pCDNA3 enthält. Die in die Zellkerne injizierten Proben enthielten  $0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  pCDNA-YFP sowie an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot in 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM  $\text{KPO}_4$ , pH 7,5. Zusätzlich wurden ca. 100 pl RNA mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$ , bzw.  $375 \mu\text{M}$  im Fall der L-dsRNA, zugegeben.

20

Die Zellen wurden bei Anregung mit Licht der Anregungswellenlänge von Texas-Rot, 568 nm, bzw. von YFP, 488 nm, mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Einzelne Zellen wurden mittels einer digitalen Kamera dokumentiert. Die Figuren 4 a - e zeigen das Ergebnis für NIH3T3-Zellen. Bei den in Fig. 4 a gezeigten Zellen ist sense-YFP-ssRNA, in Fig. 4 b antisense-YFP-ssRNA, in Fig. 4 c dsRNA-YFP, in Fig. 4 d keine RNA und in Fig. 4 e L-dsRNA injiziert worden.

30 Das jeweils linke Feld zeigt die Fluoreszenz von Zellen, die mit 568 nm angeregt wurden. Rechts ist die Fluoreszenz derselben Zellen bei Anregung mit 488 nm zu sehen. Die Texas-Rot-Fluoreszenz aller dargestellten Zellen zeigt, daß die Injektionslösung erfolgreich in die Zellkerne appliziert wurde und

05.11.02

20

getroffene Zellen nach drei Stunden noch lebendig waren. Abgestorbene Zellen zeigten keine Texas-Rot-Fluoreszenz mehr.

Die jeweils rechten Felder der Figuren 4 a und 4 b zeigen, daß  
5 die Expression des YFP bei Injektion der einzelsträngigen RNA  
in die Zellkerne nicht sichtbar inhibiert wurde. Das rechte  
Feld der Fig. 4 c zeigt Zellen, deren YFP-Fluoreszenz nach In-  
jektion von dsRNA-YFP nicht mehr nachweisbar war. Fig. 4 d  
zeigt als Kontrolle Zellen, in die keine RNA injiziert worden  
10 war. Die in Fig. 4 e dargestellte Zelle zeigt durch die Injek-  
tion der L-dsRNA, die zum YFP-Gen sequenzhomologe Bereiche  
aufweist, eine nicht mehr nachweisbare YFP-Fluoreszenz. Dieses  
Ergebnis belegt, daß auch kürzere dsRNAs zur spezifischen In-  
hibition der Genexpression bei Säugern verwendet werden kön-  
15 nen, wenn die Doppelstränge durch chemische Verknüpfung der  
Einzelstränge stabilisiert werden.

DE 2000 23 125 U1

## Literatur:

- Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M.  
(1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation ei-  
5 nes DNA-Duplexes durch *cis-trans*-Isomerisierung einer  
Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* 111, 2547-2549.
- Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtti,  
A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double  
10 helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.*  
25, 4954-4961.
- Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A system  
in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.*  
15 52, 386-390.
- Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya,  
T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. &  
Shabarova, Z.A. (1993). Oligonucleotide circularization  
20 by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.*  
21, 5403-5407.
- Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise  
localization of several covalent RNA-RNA cross-link in  
25 *Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* 136, 267-274.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E.  
& Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic inter-  
ference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.  
30 *Nature* 391, 806-811.

- Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circulaiza-  
tion of oligonucleotides by disulfide bridge formation.  
*Nucl. Acids Res.* 23, 2025-2029.
- 5 Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled  
coupling and recombination of oligonucleotide blocks con-  
taining thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* 21, 1403-  
1408.
- 10 Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein  
kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for  
an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11693-11695.
- Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of  
15 ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp.  
330-341.
- Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a  
novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice  
20 site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene blue-  
mediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6910-  
6920.
- Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solid-  
25 phase synthesis. *Chem. Eur. J.* 5, 2077-2082.
- Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehres-  
mann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human im-  
munodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup>. *Nucl.*  
30 *Acids Res.* 24, 509-514.

05.11.02

23

- Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* 22, 2326-2333.
- 5 Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* 35, 6491-6499.
- 10 Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). *In vivo* UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome trans-splicing. *Genes & Development* 5, 1859-1869.
- 15 Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* 32, 301-310.
- 20 Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* 5, 2705-2720.

DE 200 23 125 01



03.04.03

24

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Kreutzer Dr., Roland  
Limmer Dr., Stephan

5

<120> Medikament und doppelsträngiges Oligoribonukleotid zur Hemmung der  
Expression eines vorgegebenen Gens

<130> 422434EH

10

<140>  
<141>

<150> 199 03 713.2

15 <151> 1999-01-30

<150> 199 56 568.6  
<151> 1999-11-24

20 <160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 45  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>

30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
EcoRI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor

<400> 1  
ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45

35

<210> 2  
<211> 50  
<212> DNA

40 <213> Künstliche Sequenz

422434-kreutzer-an-4 DE 200 23 125 U1

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor

5 <400> 2

gggatccatt taggtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtcgata

50

<210> 3

10 <211> 340

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die  
einer Sequenz aus der "positive control DNA" des  
HeLaScribe Nuclear Extract in vitro  
Transkriptionskits der Firma Promega entspricht

20 <400> 3

ucagaucucu agaagcuuua augcgguagu uuauacacagu uaaaauugcua acgcagucag 60  
gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcgcuc aucgucaucc ucggcaccgu caccucggau 120  
gcuguaggca uaggcuuggu uaugccggua cugccggggc ucuaugcgga uaucguccau 180  
uccgacagca ugcgccaguc cuauugcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcauuu 240  
25 cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgccgcc aguccugcuc 300  
gcuucgcuac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340

<210> 4

30 <211> 363

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

35 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA, die  
einer Sequenz aus der "positive control DNA" des  
HeLaScribe Nuclear Extract in vitro  
Transkriptionskits der Firma Promega entspricht

40 <400> 4

tcagatctct agaagcttta atcggttagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60

05.11.02

26

gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcaccgt caccctggat 120  
gctgtaggca taggcttggt tatgccggtta ctgccgggcc tcttgcgga tatcgccat 180  
tccgacagca tcgccagtca ctatggcggtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240  
ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgcttg gccgccgcc agtcctgtgc 300  
5 gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360  
atc 363

<210> 5  
10 <211> 315  
<212> RNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus  
dem YFP-Gen

<400> 5  
auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60  
20 ggcgacguua acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120  
ggcaagcuga cccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc 180  
cucgugacca cccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuacccga ccacaugaag 240  
cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaagguuacg uccaggagcg caccaucuuc 300  
uucaaggacg acggc 315

25

<210> 6  
<211> 52  
<212> DNA  
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
EcoRI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor,  
35 komplementärer Bereich zum YFP-Gen

<400> 6  
ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc 52

40

<210> 7

05.11.02

05.11.03

27

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

5 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor,  
komplementärer Bereich zum YFP-Gen

10 <400> 7

gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtcgtcc ttgaagaaga tgg

53

<210> 8

15 <211> 21

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

20 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die  
einer Sequenz aus dem YFP-Gen entspricht

<400> 8

ucgagcugga cggcgacgua a

21

25

05.11.03 12:50:11

## Schutzansprüche

1. Medikament mit mindestens einem 15 bis 49 Basenpaare aufweisenden Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in Säugerzellen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweisenden Bereich I aufweist und ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildet ist.
2. Medikament mit mindestens einem Vektor zur Kodierung mindestens eines 15 bis 49 Basenpaare aufweisenden Oligoribonukleotids mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in Säugerzellen, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweisenden Bereich I aufweist und ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildet ist.
3. Medikament nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oder der Vektor in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.

5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.  
15
9. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
10. Medikament nach Anspruch 8, wobei das Virus oder Viroid  
20 ein tierpathogenes Virus oder Viroid ist.
11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 25 12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in den Zellen oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 30 13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.

14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.
15. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs II hergestellt ist.
16. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
17. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.
18. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in die komplementären Bereiche II eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.
19. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

20. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N`-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
21. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
22. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.
23. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
24. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
25. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.



26. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
27. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
28. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
10 bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
29. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
15 die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
30. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zellen menschliche Zellen sind.
- 20 31. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei darin mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs oder mindestens ein dafür kodierender Vektor enthalten sind, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei  
25 verschiedenen Zielgenen ist.
32. Medikament nach Anspruch 31, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
- 30 33. Vektor kodierend für ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in Säugerzellen, wobei die dsRNA 15 bis 49 Basenpaare aufweist und ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komple-

mentären, höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweisenden Bereich I aufweist und ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildet ist.

5

34. Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in Säugerzellen, wobei die dsRNA 15 bis 49 Basenpaare aufweist und ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, höchstens 49 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweisenden Bereich I aufweist und ein innerhalb der doppelsträngigen Struktur komplementärer Bereich II aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildet ist.

15

35. DsRNA oder Vektor nach Anspruch 33 oder 34, wobei die dsRNA oder der Vektor verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 20 36. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 35, wobei die dsRNA oder der Vektor in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 25 37. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 36, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
- 30 38. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 37, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.

39. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 38, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
- 5 40. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 39, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
41. DsRNA oder Vektor nach Anspruch 40, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 10 42. DsRNA oder Vektor nach Anspruch 40, wobei das Virus oder Viroid ein tierpathogenes Virus oder Viroid ist.
43. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 42, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 15 44. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 43, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in den Zellen oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 20 45. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 44, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt des komplementären Bereichs II durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
- 25 46. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 45, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.
- 30

47. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 46, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden des komplementären Bereichs II hergestellt ist.
- 5
48. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 47, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 10
49. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 48, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Purinen benutzte Purinanaloga gebildet ist.
- 15
50. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 49, wobei die chemische Verknüpfung durch in die komplementären Bereiche II eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.
- 20
51. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 50, wobei die chemische Verknüpfung durch in den komplementären Bereichen II anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.
- 25
52. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 51, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N`-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 30

53. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 52, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 5
54. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 53, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.
- 10 55. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 54, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in dem komplementären Bereich II durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
- 15
56. DsRNA nach einem der Ansprüche 34 bis 55, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang des komplementären Bereichs II ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
- 20
57. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 56, wobei die dsRNA oder der Vektor an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
- 25
58. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 57, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 30
59. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 58, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

03.04.03

37

60. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 59, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 5
61. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 60, wobei die dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 10 62. DsRNA oder Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 61, wobei die Zellen menschliche Zellen sind.
63. Vektor nach einem der Ansprüche 33 bis 62, wobei der Vektor für mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs kodiert, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
- 15
64. Vektor nach Anspruch 63, wobei eines der Zielgene das
- 20 PKR-Gen ist.

05.11.03

1/5

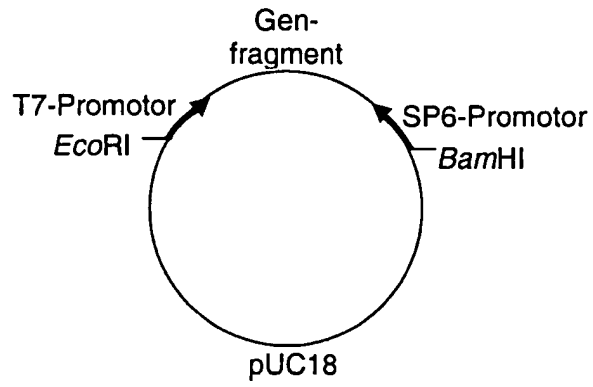


Fig. 1

DE 200 23 125 U1

05.11.03

2/5



Fig. 2

DE 200 23 125 01



05.11.02

3/5

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Fig. 3

DE 200 23 125 U1

05.11.02

4/5

Fig. 4 a

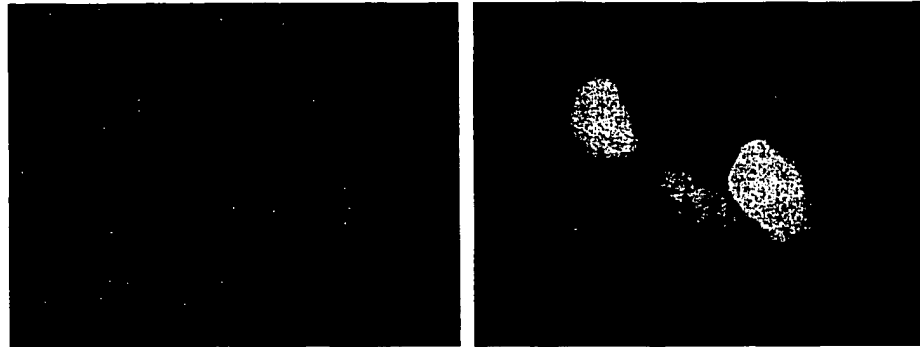


Fig. 4 b

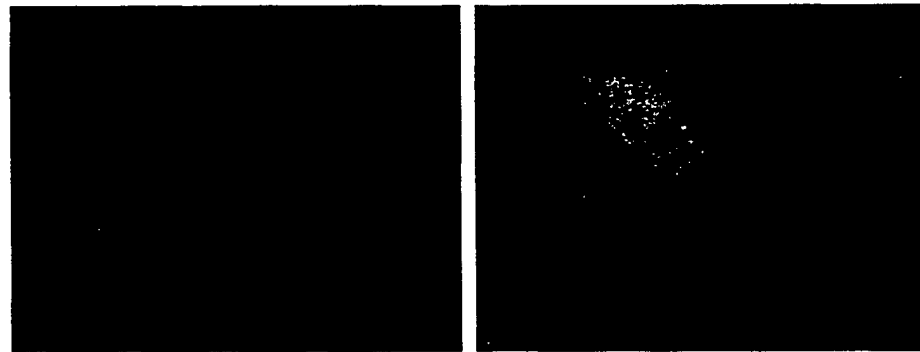


Fig. 4 c



DE 200 23 125 U1

05.11.02

5/5

Fig. 4 d



Fig. 4 e



DE 200 23 125 U1